

げっ歯類におけるシナピン酸の脳保護効果および認知改善効果

金沢大学大学院医学系研究科循環医学専攻医薬情報統御学
(旧講座名:薬剤部)
(主任:宮本謙一教授)

唐 木 田 文 仁

イトヒメハギ (*Polygala tenuifolia* WILLDENOW) の根である生薬「遠志」に含まれる tenuifoliside B[6'-(*p*-hydroxybenzoyl)-3-sinapoylsucrose]および3,6'-disinapoylsucroseが、マウスにおけるシアン化カリウム (KCN) 誘発低酸素症およびスコボラミン誘発記憶障害を抑制することを以前明らかにした。両成分は、その構造中に共通のシナポイル基を有しているため、シナポイル基が低酸素症および記憶障害を抑制していると推測された。この仮説を明らかにするためにマウス、ラットの低酸素症モデルおよび記憶障害モデルに対するシナピン酸の効果を調べた結果、シナピン酸によって KCN 誘発低酸素症およびスコボラミン誘発記憶障害が抑制された。これは tenuifoliside B および 3,6'-disinapoylsucrose の場合と同様であった。さらに、シナピン酸は、マウスにおける減圧誘発および総頸動脈結紮により誘発された低酸素症による死亡、CO₂ 誘発による記憶障害に対して抑制作用を示した。また、ラットにおける大脳基底核破壊による脳のコリン作動性障害 (アセチルコリン濃度およびコリンアセチルトランスフェラーゼ活性の低下) を抑制する効果が認められた。これらの結果を総合すると、シナピン酸は tenuifoliside B および 3,6'-disinapoylsucrose の薬理作用における重要な置換基であるというだけでなく、脳保護効果および認知改善効果を有する薬剤の候補物質であることが示唆された。

Key words シナピン酸, 記憶障害, 低酸素症, アセチルコリン, コリンアセチルトランスフェラーゼ

アルツハイマー型老年認知症, および多発梗塞性認知症は現代社会が抱える重要な問題として位置づけられている。近年, 日本における伝統的な生薬 (漢方薬) である加味帰脾湯, 人參養榮湯, および加味温胆湯に, 記憶障害やその関連行動が改善されるとの報告がある^{1)~4)}。これらの漢方薬はイトヒメハギ (*Polygala tenuifolia* WILLDENOW) の根である遠志を共通の生薬として配合していることから, 遠志は記憶障害を改善する作用があると考えられた。遠志は中医学において経験的に使用されており, 健忘, 神経衰弱症, 動悸, 夢精, および不眠症を軽減する効果があるとされている⁵⁾。遠志の記憶増強効果に関する知見が, 近年の *in vivo* および *in vitro* での複数の試験によって蓄積されつつある。遠志の水抽出物によって, マウスのスコボラミン誘発記憶障害が改善される⁶⁾ことや, 遠志を含む薬剤である DX-9386 によって, マウスのエタノールおよびスコボラミン誘発記憶障害が改善される⁷⁾ことが報告されている。Yabe ら⁸⁾は, 遠志の水抽出物が, *in vitro* においてコリンアセチルトランスフェラーゼ (choline acetyltransferase, ChAT) 活性を賦活し, 神経成長因子 (nerve growth factor, NGF) の分泌が増加することを報告している。しかし, 遠志中の成分の薬理効果については, 十分な研究はなされていない。このような背景を踏まえ, 近年遠志から分離された成分の中で, tenuifoliside B[6'-(*p*-hydroxybenzoyl)-3-sinapoylsucrose] および 3,6'-disinapoylsucrose が, シアン化カリウム (KCN) 誘発低酸素症およびスコボラミン誘発記憶障害を抑制することが明らかにされた⁹⁾。従って,

この2つの成分が遠志の脳保護効果および認知改善効果に関与していると推測された。興味深い点としては, いずれの成分とも化学構造中にシナポイル基 (C₁₁H₁₁O₄) を有することから, シナピン酸 (sinapic acid) が脳保護効果および認知改善効果を有する薬剤の候補物質である可能性が示唆される。

本試験では, この仮説を明らかにするため, 低酸素症および健忘に関する様々な動物モデルを用いて, シナピン酸が脳保護効果および認知改善効果を有するか否かについて検討した。

材料および方法

1. 材料

1. 薬剤および試薬

実験には, シナピン酸の水溶性型であるシナピン酸ナトリウムを使用した (図1)。シナピン酸ナトリウム (4.92g) は, シナピン酸 (4.48g) (和光純薬工業株式会社, 大阪) を 0.1M NaOH200ml に溶解した溶液を乾燥凍結して得た。アセチルコリン (acetylcholine, ACh) 測定の内部標準である EHC (ethylhomocholine iodide) は, 3-ジメチルアミノ-1-プロパノールとヨードエタン (シグマアルドリッチ ジャパン株式会社, 東京) から合成した。分析に用いた他の試薬は, 高純度の市販品を使用した。

2. 試験動物

KCN 誘発致死および減圧低酸素誘発致死に対する評価には雄性 ICR マウス (7週齢), CO₂ またはスコボラミン誘発による

平成20年2月4日受付, 平成19年3月17日受理

Abbreviations: ACh, acetylcholine; ChAT, choline acetyltransferase; EHC, ethylhomocholine iodide

健忘についての評価には雄性ddYマウス(8週齢)を用いた(日本エスエルシー株式会社, 浜松)。また脳内のACh含量, およびコリンアセチルトランスフェラーゼ(choline acetyltransferase, ChAT)活性の評価には雄性のウイスターラット(8週齢)を用いた(日本チャールス・リバー株式会社, つくば)。飼育は室温 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, および相対湿度 $55 \pm 10\%$ の施設内で行い, 照明管理については1日の点灯時間を07:00から19:00とした。動物には水および標準試料(MF, オリエンタル酵母工業株式会社, 東京)を自由に摂取させた。ただし実験開始の18時間前から絶食させた。

すべての実験手順は, 株式会社ツムラの試験動物委員会により承認済みの「実験動物の管理と使用に関する指針」に沿って行った。

II. 方法

1. シナピン酸のKCN誘発低酸素症に対する作用

シナピン酸は 3mg/kg ($n=15$), 10mg/kg ($n=12$), 100mg/kg ($n=8$), 対照群には生理食塩水 10ml/kg ($n=17$)を経口投与(*p.o.*)した。60分後, 生理食塩水に溶解させたKCN (2mg/kg)をすべてのマウスに静脈注射(*i.v.*)した。その後KCN誘発による昏睡時間を記録した。昏睡状態は, KCN静脈注射後の正向反射の消失により判断した。

2. シナピン酸の減圧低酸素症に対する作用

シナピン酸 (10mg/kg および 100mg/kg , *p.o.*, 各群 $n=16$) または, 生理食塩水 (10ml/kg , *p.o.*, $n=16$) をマウスに投与した。60分後, 各マウスを減圧室に入れ, 真空ポンプを用いて内部気圧を 160mmHg まで減圧した。シナピン酸が減圧低酸素症に対する作用については死亡率の計測により評価し, 減圧開始から呼吸運動停止までの生存時間を記録した。

3. シナピン酸の総頸動脈結紮誘発低酸素症に対する作用

シナピン酸が総頸動脈結紮誘発低酸素症に及ぼす影響については, 結紮後の死亡率の計測により評価した。シナピン酸を 10mg/kg ($n=24$) および 100mg/kg ($n=28$) の投与量でマウスに経口投与し, また対照群には生理食塩水 (10ml/kg , $n=25$) を経口投与した。60分後, 全マウスの総頸動脈を非麻酔下で結紮した。結紮後, 結紮誘発による死亡率を30分から240分の間計測した。

4. シナピン酸の CO_2 誘発健忘に対する作用

48匹のマウスを CO_2 未処理群 ($n=12$) と CO_2 処理群 ($n=36$) に分けた。 CO_2 処理群はさらに3群に分け, CO_2 コントロール群 ($n=13$), CO_2 +シナピン酸 10mg/kg 群 ($n=14$), CO_2 +シナピン酸 100mg/kg 群 ($n=9$) とした。シナピン酸 (10mg/kg または

100mg/kg) および生理食塩水 (10ml/kg) は受動的回避試験における獲得試行の60分前に腹腔内投与した。

CO_2 誘発健忘に対するシナピン酸の効果は, ステップスルー型受動回避装置(株式会社ニューロサイエンス, 東京)¹⁰⁾を使用し評価した。この装置は, 2つの区画からなり, 1つは照明がついている明室 ($130\text{mm} \times 50\text{mm} \times 90\text{mm}$, 17W , 1500lx), もう1つは暗室 ($170\text{mm} \times 50\text{mm} \times 90\text{mm}$) となっている。この区画はギロチン型ドアで仕切られている。獲得試行ではマウスを明室に入れ, 3秒後ギロチンドアを開ける。マウスが暗室に入るとギロチンドアが自動的に閉まり, 暗室のグリッド床に1~2秒間通電 (foot-shock: 0.01mA , 200V , 50Hz) される。マウスが明室から暗室に入るまでの明室滞在時間を反応潜時 (Latency time) として測定した。獲得試行後, CO_2 群のマウスは CO_2 を満たした箱に速やかに移し, 8秒間置いた。対照群のマウスは室内大気を満たした同様の箱に入れ, 同様の時間放置した。24時間後, 回避学習 (保持試行) について評価した。本装置の明室に入れ, 反応潜時を測定した。反応潜時が600秒を超えた時, 回避記憶は保持されていると判断した。

5. シナピン酸のスコボラミン誘発健忘に対する作用

100匹のマウスを対照群 (生理食塩水 10ml/kg , $n=20$) とスコボラミン投与群 ($n=80$) に分けた。スコボラミン投与群はさらに4群に分け, スコボラミンコントロール群 ($n=20$), スコボラミン+シナピン酸 3mg/kg 群 ($n=20$), スコボラミン+シナピン酸 10mg/kg 群 ($n=20$), スコボラミン+シナピン酸 100mg/kg 群 ($n=20$) とした。

シナピン酸のスコボラミン誘発健忘に対する評価には, 前述と同様のステップスルー型受動回避装置を使用した。各群のすべてのマウスについて獲得試行を行い, スコボラミン (0.3mg/kg , *i.p.*) および生理食塩水 (10ml/kg , *i.p.*) の投与は獲得試行の15分前に行った。24時間後, 保持試行を実施した。シナピン酸 (3 , 10 , または 100mg/kg , *p.o.*) および生理食塩水 (10ml/kg , *p.o.*) は, 保持試行の60分前に投与した。反応潜時が300秒を超えた時, 回避記憶は保持されていると判断した。

6. 前脳基底部破壊により誘発された脳のACh濃度およびChAT活性の低下に対するシナピン酸の作用

80匹のラットを偽処置群 ($n=20$) とイボテン酸 (ibotenic acid) 誘発前脳破壊群 ($n=60$) に分けた。前脳破壊群はさらに3群に分け, イボテン酸コントロール群 ($n=20$), イボテン酸+シナピン酸群 (3mg/kg または 10mg/kg , 各群 $n=20$) とした。

すべてのラットはペントバルビタール (50mg/kg , *i.p.*) により麻酔した。前脳破壊群にはイボテン酸 ($10\mu\text{g}/2.0\mu\text{l}$) を偽処置群には生理食塩水 ($2.0\mu\text{l}$) を両側のマイネルト基底核に注入した (座標: プレグマの後方 1.8mm , 両側方 3.2mm , 硬膜の腹側方 6.5mm)。シナピン酸 (3mg/kg , 10mg/kg , 各群 $n=20$) および蒸留水 (10ml/kg , $n=20$) は, イボテン酸注入から7日間経口投与した。偽処置ラットには蒸留水 (10ml/kg , *p.o.*, $n=20$) を7日間投与した。8日目には, 脳内のACh濃度を測定するため, 各群のラットの半分 ($n=10$) は 1.10 秒間, 8.5KW のマイクロ波を照射¹¹⁾ (NJEモデル2603, 新日本無線株式会社, 埼玉) した。残り半分 ($n=10$) は脳内のChAT活性を測定した¹²⁾。

脳内のACh濃度を測定するため¹²⁾, マイクロ波を照射した脳は速やかに摘出し, 前頭皮質および頭頂皮質を解剖した。得られた組織は, 超音波細胞破碎機により内部標準のEHC 10nmol を含む, 1ml の 0.05MHCIO_4 中で60秒間ホモナイズした。ホ

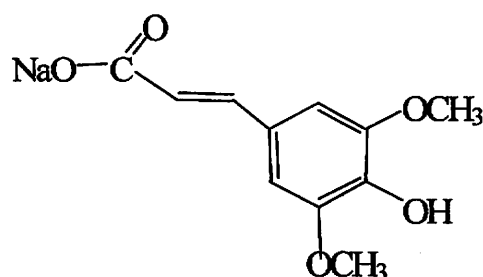


Fig. 1. Chemical structure of sodium sinapate.

モジネートは20,000×g, 4℃で15分間遠心分離した。上清は0.45 μmのミリポアフィルターに通して精製した。濾液の一定分量を、電気化学検出器付高速液体クロマトグラフィ装置 (high performance liquid chromatograph equipped with an electrochemical detector, HPLC-ECD) に注入し、測定した。

また脳内のChAT活性を測定するため¹³⁾, 断頭したラットから脳を速やかに摘出し、水中で頭頂皮質を解剖した。得られた組織は、超音波細胞破碎機を用いて10mlの0.1Mリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) 中でホモジナイズした。ホモジネートは、電気化学検出器付高速液体クロマトグラフィ装置 (HPLC-ECD) によるChAT分析¹³⁾, およびBio-Radタンパク分析キット (Bio-Rad Laboratory, Richmond, USA) によるタンパク分析に使用した。

Ⅲ. 統計解析

得られたデータは平均値±標準誤差 ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) で表した。各群間における平均値の有意性はKCN誘発健忘、減圧低酸素症、および前脳基底部病変誘発による脳中ACh濃度およびChAT活性については一元配置分散分析の後にDunnett検定により評価した。総頸動脈結紮誘発低酸素症における死亡率、またCO₂誘発健忘およびスコボラミン誘発健忘の明室に留まったマウス (回避行動を学習したマウス) の割合については2×2クロス集計表にて期待度数を算出し、度数が5以上の場合にはChi-square検定、5以下の場合にはFisher's exact probability (両側) 検定により評価した。CO₂誘発健忘およびスコボラミン誘発健忘の保持試行における反応潜時はMann-Whitney検定により評価した。いずれの検定においてもp値が0.05以下を有意差ありとした。

成 績

I. 試験結果

1. シナピン酸のKCN誘発低酸素症に対する作用

シナピン酸のKCN誘発低酸素症に対する作用を評価するため、正向反射の消失により判断される昏睡時間を計測した。表1に示したように、KCN (2mg/kg) によって正向反射が281.0±33.9秒間消失した。シナピン酸の前処置 (3-100mg/kg) により、KCN誘発による昏睡時間が用量依存的に有意に抑制された。

2. シナピン酸の減圧低酸素症に対する作用

シナピン酸の減圧低酸素症に対する作用を評価するため、減圧室で試験動物が死亡するまでの時間を計測した。その結果を表2に示した。コントロール群の減圧室中での生存時間は66.5±2.0秒であった。シナピン酸による前処置 (10mg/kg および100mg/kg) により、生存時間が有意に延長された。

3. シナピン酸の総頸動脈結紮誘発低酸素症に対する作用

シナピン酸の総頸動脈結紮誘発低酸素症に対する作用を評価するため、結紮後240分間のマウスの死亡率を測定した。図2に示すように、コントロール群の死亡率は時間経過とともに増加し、結紮後240分の時点で死亡率は92%であった。シナピン酸による前処置 (10mg/kg および100mg/kg) において、シナピン酸10mg/kg投与群では有意な抑制は認められなかったが、シナピン酸100mg/kg投与群では結紮誘発死亡率が有意に抑制された。特に、有意な死亡率抑制が認められたのは、結紮後60分、および150分から240分の時点であった。

4. シナピン酸のCO₂誘発健忘に対する作用

表3には、回避行動を学習したマウスの割合および保持試行

Table 1. Effects of sinapic acid on KCN-induced hypoxia

Treatment	Dose (mg/kg, <i>p.o.</i>)	<i>n</i>	Coma time (sec)
Control (saline)	—	17	281.0±33.9
Sinapic acid	3	15	162.8±30.2*
Sinapic acid	10	12	149.5±30.8*
Sinapic acid	100	8	116.3±21.0***

Each value represents the $\bar{x} \pm \text{SEM}$. **p*<0.05 and ****p*<0.001 vs control. The degree of hypoxia was evaluated by measuring the duration of coma induced by KCN.

Table 2. Effects of sinapic acid on hypobaric hypoxia

Treatment	Dose (mg/kg, <i>p.o.</i>)	<i>n</i>	Survival time (sec)
Control (saline)	—	16	66.5±2.0
Sinapic acid	10	16	76.8±2.3**
Sinapic acid	100	16	79.0±2.4***

Each value represents the $\bar{x} \pm \text{SEM}$. ***p*<0.01 and ****p*<0.001 vs control. Drug was administered 60 min before the induction of hypoxia (30 s at 160 mmHg). The degree of hypobaric hypoxia was evaluated by measuring survival time until mice died in the decompression chamber

Table 3. Effect of sinapic acid on CO₂-Induced impairment of passive avoidance performance

Treatment	Dose (mg/kg)	<i>n</i>	CO ₂	Number of animals retaining memory (%)	Latency (sec)
Control (saline)	—	12	—	9/12 (75.0%)	543.3±35.7
Control (saline)	—	13	+	1/13 (7.6%)#	279.3±41.6#
Sinapic acid	10	14	+	3/14 (21.4%)	342.6±46.4
Sinapic acid	100	9	+	5/9 (55.6%)*	443.9±63.4*

Each value represents the $\bar{x} \pm \text{SEM}$. #*p*<0.05 and ***p*<0.01 vs non CO₂-treated control, **p*<0.05 vs CO₂-treated control (Number of animals retaining memory (%): Fisher's exact probability test, Latency (sec): Mann-Whitney test). Drug or saline (10 ml/kg) was administered *i.p.* 60 min before the acquisition trial of the passive-avoidance test.

Table 4. Effect of sinapic acid on scopolamine-induced impairment of passive avoidance performance in mice

Treatment	Dose (mg/kg)	Scopolamine	Number of animals retaining memory (%)	Latency (sec)
Control (saline)	—	—	16/20 (80%)	268.9±15.8
Control (saline)	—	+	2/20 (10%)#	153.2±18.7#
Sinapic acid	3	+	6/20 (30%)	187.2±25.1
Sinapic acid	10	+	9/20 (45%)*	234.5±19.7*
Sinapic acid	100	+	11/20 (55%)**	227.6±21.7*

Each value represents the $\bar{x} \pm \text{SEM}$. (*n*=20). ##*p*<0.01 vs non-scopolamine treated control, **p*<0.05 and ***p*<0.01 vs scopolamine-treated control (Number of animals retaining memory (%): Chi-square test, Latency (sec): Mann-Whitney test). Drug was *p.o.* administered 60 min before retention trial.

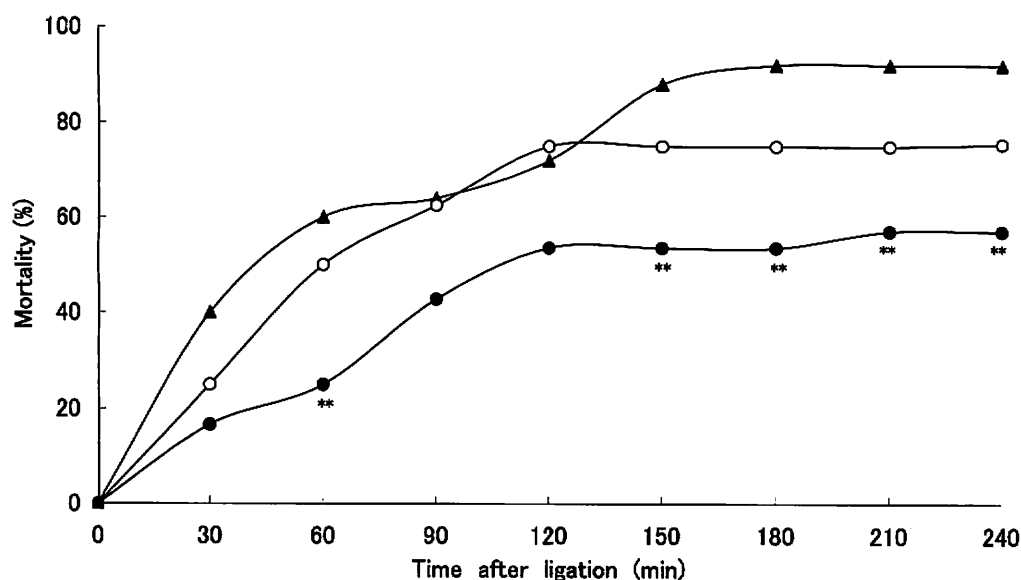


Fig. 2. Effect of sinapic acid on mortality in carotid artery-ligated mice
 ● Sinapic acid (100 mg/kg), ○ Sinapic acid (10 mg/kg), ▲ Control (saline): ** $p < 0.01$ compared with the control value. Drugs or saline (10 ml/kg) were administered p.o. 60 min before the ligation of bilateral carotid arteries.

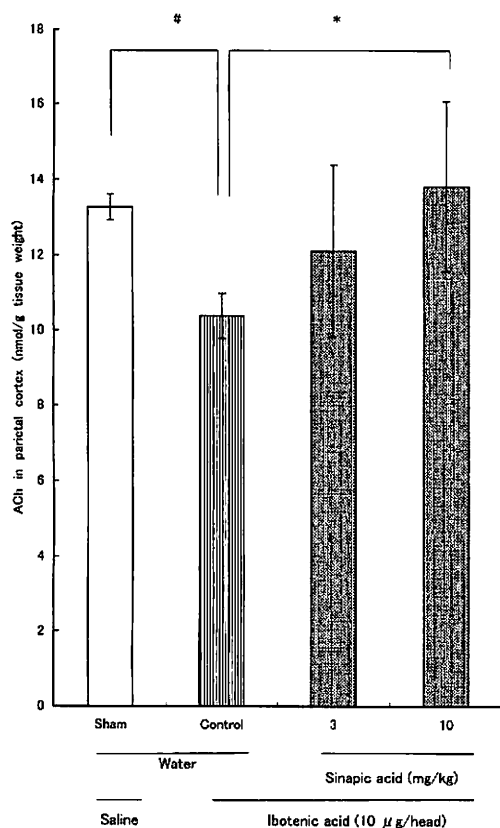


Fig. 3. Effect of sinapic acid on ACh concentration in cerebral parietal cortex of basal forebrain-lesioned rats. Basal forebrain-lesioned rats were administered sinapic acid (3 or 10 mg/kg, p.o.) for 7 days. After 7 days, all rats were sacrificed by exposure to microwave irradiation to the head, and then the ACh concentration in the cerebral parietal cortex was determined by the HPLC-ECD method. Data are expressed as $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ($n=10$). # $p < 0.05$ compared with sham group, * $p < 0.05$ compared with the ibotenic acid-treated control group.

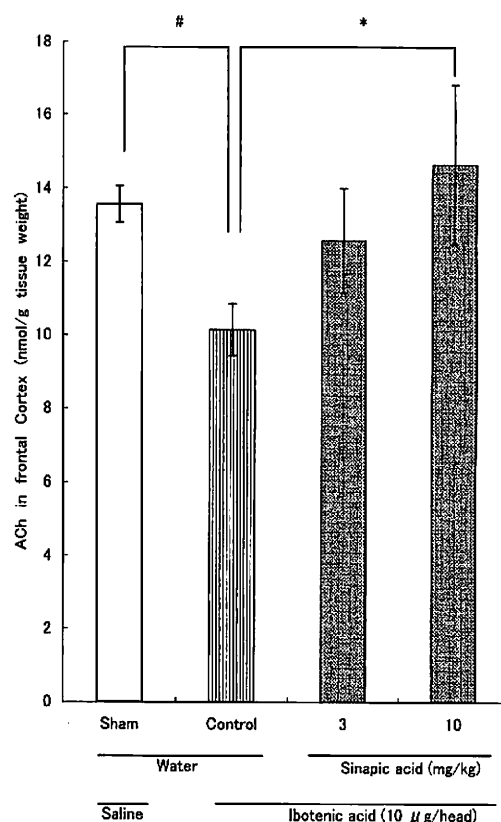


Fig. 4. Effect of sinapic acid on ACh concentration in cerebral frontal cortex of basal forebrain-lesioned rats. Basal forebrain-lesioned rats were administered sinapic acid (3 or 10 mg/kg, p.o.) for 7 days. After 7 days, all rats were sacrificed by exposure to microwave irradiation to the head, and then ACh concentration in the cerebral frontal parietal cortex was determined by the HPLC-ECD method. Data are expressed as $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ($n=10$). # $p < 0.05$ compared with sham group, * $p < 0.05$ compared with the ibotenic acid-treated control group.

における反応潜時の平均を示した。CO₂未処理群では、600秒を超えて明室に留まったマウスは75% (9/12) であり、反応潜時の平均は543.3 ± 35.7秒であった。一方、CO₂処理マウスではCO₂未処理群に比べて、回避行動学習マウスの割合および反応潜時の平均は有意に減少した。これらの回避行動学習マウスの割合および反応潜時の減少は、シナピン酸の前処置 (10mg/kg および100mg/kg) により、用量依存的に有意に抑制された。

5. シナピン酸のスコボラミン誘発健忘に対する作用

表4には、回避行動を学習したマウスの割合、および保持試行における反応潜時の平均を示した。スコボラミン投与マウスの回避行動学習マウスの割合 (10%) および反応潜時の平均 (153.2 ± 18.7秒) は、スコボラミン非投与対照群 (80%, 268.9 ± 15.8秒) と比較して、有意に減少した ($p < 0.01$)。これらのスコボラミン誘発学習能低下 (学習マウスの割合および反応潜時の減少) はシナピン酸の前処置 (3-100mg/kg) により用量依存的に抑制された。

6. 前脳基底部破壊により誘発された脳のACh濃度およびChAT活性の低下に対するシナピン酸の作用

イボテン酸投与ラットの頭頂葉大脳皮質および前頭葉大脳皮質のACh濃度に対するシナピン酸 (3mg/kg および10mg/kg) の作用については、それぞれ図3および図4に示した。イボテ

ン酸投与により、頭頂葉大脳皮質および前頭葉大脳皮質中のACh濃度が低下した。シナピン酸の前処置により、両皮質でのACh濃度の低下は用量依存的に抑制され、両皮質とも10mg/kgの用量で有意な抑制が認められた。

シナピン酸 (3mg/kg および10mg/kg) がイボテン酸投与ラットの頭頂皮質のChAT活性に及ぼす影響については図5に示した。イボテン酸投与によって頭頂葉大脳皮質におけるChAT活性が低下し、シナピン酸の前処置によりChAT活性の低下は用量依存的に抑制され、10mg/kgの用量で有意な抑制が認められた。

考 察

今回の研究において、複数の低酸素症モデルすなわち、KCN誘発による昏睡時間、減圧および総頸動脈結紮による死亡率を測定することで、シナピン酸の脳保護効果について検討した。KCN誘発による昏睡は細胞呼吸酵素であるミトコンドリア・チトクロームオキシダーゼを阻害することにより脳細胞障害性の低酸素症が生じると考えられている¹⁶⁾。減圧および総頸動脈結紮では、脳への酸素供給が減少し (低酸素症)、その状態が続くと死に至る¹⁵⁾。シナピン酸によりKCN誘発による昏睡時間、減圧および総頸動脈結紮誘発による死亡率が抑制された。この結果は、シナピン酸が脳低酸素症を抑制することを強く示唆するものである。低酸素および虚血は、脳神経細胞死を誘発することが知られている¹⁶⁾¹⁷⁾。これらを総合すると、シナピン酸は脳神経細胞の損傷や死滅に対する保護効果を有すると考えられる。

動物、ヒトともに、低酸素症により記憶および学習に障害が生じることが良く知られている¹⁸⁾¹⁹⁾。例えば、一過性脳虚血および低酸素症は記憶に非常に重要な大脳皮質および海馬において、遅発性神経障害を引き起こす²⁰⁾²¹⁾。これらの知見は、シナピン酸には低酸素誘発の記憶障害をも抑制する可能性があることを示すものである。この仮説を明らかにするため、シナピン酸の低酸素誘発による記憶障害に及ぼす影響について、低酸素誘発健忘の一つであるCO₂誘発記憶障害モデルを用いて検討した。保持試行では、受動回避試験での反応潜時がCO₂の吸入により有意に減少した (表3)。Foot-shockによる回避反応の獲得後、保持試行における反応潜時は、記憶の保持状況を反映すると考えられるので²²⁾²³⁾、反応潜時の減少は記憶の障害を意味する。シナピン酸はCO₂誘発記憶障害を有意に抑制した。この結果は、神経細胞死または低酸素症に起因する損傷を抑制することでシナピン酸の抗健忘効果が生じた可能性を示唆している。

低酸素症は神経細胞死だけでなく、記憶障害と密接に関連するシナプス前部のコリン作動性神経の障害を誘発する。例えばシナプトソームにおいて、KCNは神経終末からカリウム刺激によるACh放出を減少させる²⁴⁾²⁵⁾。コリン作動性神経のシナプス前終末は虚血障害に対して脆弱であり、コリン作動性神経の障害は海馬におけるシナプス後のCA1錐体細胞の死滅につながっていく¹⁶⁾。そこで、シナピン酸がコリン作動性機能を直接調節するかどうかを確かめるため、スコボラミン誘発健忘に対する影響について検討した。スコボラミンはムスカリン性ACh受容体を阻害することで、深刻な健忘または記憶障害を引き起こすが²⁶⁾、これは低酸素性健忘とは異なる。シナピン酸は、健忘を示唆する保持試行における受動的回避試験でのスコボラミン誘発による反応潜時の減少を抑制した (表4)。

さらに、シナピン酸の脳内コリン作動性神経伝達系に対する

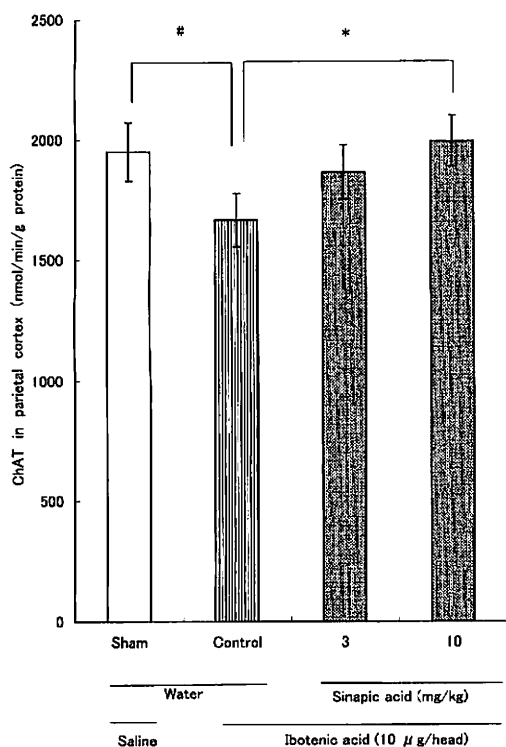


Fig. 5. Effect of sinapic acid on ChAT activity in cerebral parietal cortex of basal forebrain-lesioned rats.

Basal forebrain-lesioned rats were administered sinapic acid (3 or 10 mg/kg, p.o.) for 7 days. After 7 days, all rats were decapitated, and the whole brain was dissected. ChAT activity in the cerebral cortex was determined by the HPLC-ECD method. Data are expressed as $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ($n=10$). # $p < 0.05$ compared with sham group, and * $p < 0.05$ compared with the ibotenic acid-treated control group.

作用,例えば,コリン作動性の神経伝達物質であるACh濃度,およびアセチルコリン合成酵素であるChAT活性に対する作用についての検証は,神経細胞体を選択的に破壊するイボテン酸による前脳基底部破壊ラットを用いて試験が行われた²⁷⁾.また,前脳基底部のコリン作動性神経は,学習および記憶のプロセスにおいて重要な役割を占めている大脳皮質のコリン作動性神経支配の大部分を担っている²⁸⁾²⁹⁾.それゆえ,大脳皮質におけるコリン作動性機能を低下させる有効な方法として,イボテン酸による前脳基底部の破壊が頻用されている.前脳基底部へのイボテン酸の微量注射により,頭頂葉大脳皮質および前頭葉大脳皮質におけるACh濃度が,また頭頂葉大脳皮質におけるChAT活性が低下した.シナピン酸は,このACh濃度およびChAT活性の減少を抑制した(図3,4,5).Yabeら⁹⁾の報告では,シナピン酸は,前脳基底部破壊ラットにおいて前頭葉大脳皮質のChAT活性低下を抑制した.これらの結果は,シナピン酸がコリン作動性機能(AChおよびChAT)を活性化させることで,記憶障害を改善することを示唆するものである.

以前,遠志のメタノール抽出物(50-500mg/kg)が,マウスにおけるKCN誘発低酸素症およびスコボラミン誘発記憶障害を抑制することを証明した⁹⁾が,その際の遠志のメタノール抽出物中のtenuifolioside Bおよび3,6'-disinapoylsucroseは,それぞれ1.1%(0.55-5.5mg/kg)および7.3%(3.65-36.5mg/kg)であった.今回の試験では,tenuifolioside Bおよび3,6'-disinapoylsucroseに共通のシナポイル基に相当するシナピン酸(10-100mg/kg)は,tenuifolioside B(3-100mg/kg)および3,6'-disinapoylsucrose(10-100mg/kg)と同様にKCN誘発低酸素症およびスコボラミン誘発記憶障害を抑制した.さらに,シナピン酸はマウスにおける減圧低酸素症または総頸動脈結紮誘発による死亡率やCO₂誘発による記憶障害を,またラットにおける前脳基底部破壊による脳のコリン作動性障害(ACh濃度およびChAT活性の低下)を抑制した.これらの結果を総合すると,シナピン酸はtenuifolioside Bおよび3,6'-disinapoylsucroseにおける重要な部分構造であるというだけでなく,脳保護効果および認知改善効果を有する薬剤の候補物質であることが示唆される.

結 論

今回,マウス・ラットにおけるシナピン酸の脳保護効果および認知改善効果について検討し,以下の結果を得た.

1. KCN誘発低酸素症に対する試験において,シナピン酸の投与(3-100mg/kg)によりKCN誘発による昏睡時間を用量依存的に有意に抑制した.
2. 減圧低酸素症に対する試験において,シナピン酸の投与(10,100mg/kg)により生存時間が有意に延長された.
3. 総頸動脈結紮誘発低酸素症に対する試験において,シナピン酸の投与(100mg/kg)により有意に死亡率抑制を認めた(60分,150-240分).
4. CO₂誘発健忘に対する試験において,シナピン酸の投与(10,100mg/kg)により反応潜時の減少を用量依存的に抑制した.
5. スコボラミン誘発健忘に対する試験において,シナピン酸の投与(3-100mg/kg)により反応潜時の減少を用量依存的に抑制した.
6. 前脳基底部破壊により誘発された脳のACh濃度の試験において,シナピン酸の投与(10mg/kg)により頭頂葉大脳皮質および前頭葉大脳皮質でのACh濃度の低下を有意に抑制した.

また,ChAT活性の試験において,シナピン酸の投与(10mg/kg)により頭頂葉大脳皮質でのChAT活性の低下を有意に抑制した.

よって,シナピン酸により脳神経細胞の損傷や細胞死に対する脳保護効果が示唆された.また,コリン作動神経に作用することにより記憶障害を改善することが示唆された.

謝 辞

稿を終えるに臨み,御指導,御校閲を賜りました金沢大学大学院医学系研究科循環医学専攻医業情報統御学 宮本謙一教授に深甚の謝意を捧げます.また,本研究の遂行にあたって御指導および御協力いただいた,(株)ツムラ 池谷幸信博士,五十嵐康博士,竹田秀一博士,綱川光男氏,山口琢児氏および武蔵野大学 油田正樹教授に深謝致します.

文 献

- 1) 泉義雄,五十棲一男.加味帰脾湯による記憶力障害改善効果の検討.日本東洋医学雑誌,50:159,2000
- 2) 鈴木朋子,荒井啓行,佐々木英忠.アルツハイマー病における加味温胆湯の効果.漢方と最新治療,10:313-318,2001
- 3) 泉義雄,小林泉,菊地泰宗.加味帰脾湯による記憶力障害改善効果の検討-正常老化群と痴呆群の比較.神奈川医学雑誌,27:213-214,2000
- 4) 丸山哲弘.高齢アルツハイマー病患者の自発性障害,感情障害に対するドネペジルと加味帰脾湯の併用療法.日本東洋医学雑誌,53:170,2002
- 5) Chang HM, But PPH. YUANZHI 遠志. Pharmacology and Applications of Chinese Materia Medica, Vol.1,1st ed, p551-553, World Scientific Publishing Co. Ltd., Singapore 1986
- 6) Egashira N, Yuzurihara M, Hattori N, Sakakibara I, Ishige A. Ninjin-yoei-to(Ren-Shen-Yang-Rong-Tang) and Polygalae radix improves scopolamine-induced impairment of passive avoidance response in mice. Phytomedicine 10: 467-473, 2003
- 7) Nishiyama N, Zhou Y, Takashima K, Saito H. Effects of DX-9386,a traditional chinese preparation,on passive and active avoidance performances in mice. Biol Pharm Bull 17: 1472-1476, 1994
- 8) Yabe T, Iizuka S, Komatsu Y,Yamada H. Enhancements of choline acetyltransferase activity and nerve growth factor secretion by Polygalae radix-extract containing active ingredients in Kami-untan-to. Phytomedicine 4: 199-205, 1997
- 9) Ikeya Y, Takeda S, Tunakawa M, Karakida H, Toda K, Yamaguchi T, Aburada M. Cognitive improving and cerebral protective effects of acylated oligosaccharides in *Polygala tenuifolia*. Biol Pharm Bull 27: 1081-1085, 2004
- 10) Ikarashi Y, Kuribara H, Shiobara T, Takahashi A, Ishimaru H, Maruyama Y. Learning and memory in mice treated with choline oxidase,a hydrolytic enzyme for choline. Pharmacol Biochem Behav 65: 519-522, 2000
- 11) Ikarashi Y, Maruyama Y, Stavinoha WB. Study of the use microwave magnetic field for the rapid inactivation of brain enzymes. Japan J Pharmacol 35: 371-387, 1984
- 12) Ikarashi Y, Iwatsuki H, Blank CL, Maruyama Y. Glassy carbon pre-column for direct determination of acetylcholine and choline in biological samples using liquid chromatography with electrochemical detection. J Chromatogr 575: 29-37, 1992

- 13) Ikarashi Y, Maruyama Y. Liquid chromatographic determination of choline acetyltransferase and acetylcholinesterase activities in rat brain. *Pharmacology Communications* 3: 27-38, 1993
- 14) Isom GE, Burrows GE, Way JL. Effect of oxygen on the antagonism of cyanide intoxication-cytochrome oxidase, *in vivo*. *Toxicol Appl Pharmacol* 65: 250-256, 1982
- 15) 竹尾聡, 田野中浩一, 平野智行, 三宅慶子, 岡本淳子. Naftidrofuryl oxalateの脳保護作用 I 両側総頸動脈結紮マウスの延命効果およびエネルギー代謝改善効果. *日薬理誌*, 91: 267-273, 1988
- 16) Ishimaru H, Takahashi A, Ikarashi Y. Temporal changes in extracellular acetylcholine and CA1 pyramidal cells in gerbil hippocampus following transient cerebral ischemia. *Brain Res* 639: 66-72, 1994
- 17) Ishimaru H, Takahashi A, Ikarashi Y, Maruyama Y. Immunohistochemical and neurochemical studies of hippocampal cholinergic neurons after ischaemia. *Neuroreport* 6: 557-560, 1995
- 18) Allweis C, Gibbs ME, Ng KT, Hodge RJ. Effects of hypoxia on memory consolidation: implications for a multistage model of memory. *Behav Brain Res* 11: 117-121, 1984
- 19) Schaffler K, Klausnitzer W. Randomized placebo-controlled double-blind cross-over study on antihypoxidotic effects of piracetam using psychophysiological measures in healthy volunteers. *Alzheimersforsch* 38: 288-291, 1988
- 20) Pulsinelli WA, Brierley JB, Plum F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol* 11: 491-498, 1982
- 21) Ishimaru H, Takahashi A, Ikarashi Y, Maruyama Y. NGF delays rather than prevents the cholinergic terminal damage and delayed neuronal death in the hippocampus after ischemia. *Brain Res* 789: 194-200, 1998
- 22) Jodar L, Takahashi M, Kaneto H. FS stress induces long-lasting memory facilitation: involvement of cholinergic pathways. *Pharmacol Biochem Behav* 53: 735-740, 1996
- 23) Ikarashi Y, Harigaya Y, Tomidokoro Y, Kanai M, Ikeda M, Matsubara E, Kawarabashi T, Kuribara H, Youkin SG, Maruyama Y, Shoji M. Decreased level of brain acetylcholine and memory disturbance in APPsw mice. *Neurobiol Aging* 25: 483-490, 2004
- 24) Amano M, Goto A, Takahashi N, Hasegawa T, Nabeshima T. Effects of BMY-21502 on anoxia in mice. *Japan J Pharmacol* 61: 157-163, 1993
- 25) Gibson GE, Manger T, Toral-Barza L, Freeman G. Cytosolic-free calcium and neurotransmitter release with decreased availability of glucose or oxygen. *J Neurochem Res* 14: 437-443, 1989
- 26) Givens B, Olton DS. Bidirectional modulation of scopolamine-induced working memory impairments by muscarinic activation of the medial septal area. *Neurobiol Learn Mem* 63: 269-276, 1995
- 27) Volpe BT, Davis HP, Towle A, Dunlap WP. Loss of hippocampal CA1 pyramidal neurons correlates with memory impairment in rats with ischemic or neurotoxin lesions. *Behav Neurosci* 106: 457-464, 1992
- 28) Bartus RT, Dean RL, Pointecorvo JM, Flicker C. The cholinergic hypothesis: a historical overview, current perspective, and future directions. *Ann NY Acad Sci* 444: 332-358, 1985
- 29) Dekker AJ, Connor DJ, Thal LJ. The role of cholinergic projections from nucleus basalis in memory. *Neurosci Biobehav Rev* 15: 299-317, 1991

Cerebral Protective and Cognition-improving Effects of Sinapic Acid in Rodents Fumito Karakida, Department of Medicinal Informatics, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 Jusen Med. Soc., 117, 2 – 9 (2008)

Key words sinapic acid, memory impairment, anoxia, acetylcholine, choline acetyltransferase

Abstract

We previously demonstrated that tenuifolioside B[6'-(*p*-hydroxybenzoyl)-3-sinapoylsucrose] and 3,6'-disinapoylsucrose in *Polygalae Radix*, the root of *Polygala tenuifolia* WILLDENOW, inhibited potassium cyanide (KCN)-induced hypoxia and scopolamine-induced memory impairment in mice. Because both ingredients have a common sinapoyl moiety in their structure, we inferred that the sinapoyl moiety could inhibit hypoxia and memory impairment. In the present study, I showed that sinapic acid inhibits KCN-induced hypoxia and scopolamine-induced memory impairment as well as tenuifolioside B and 3,6'-disinapoylsucrose does. In addition, sinapic acid inhibited decompression- or carotid artery ligation-induced hypoxia (or mortality) and CO₂-induced impairment in mice, and basal forebrain lesion-induced cerebral cholinergic dysfunction (decreases in acetylcholine concentration and choline acetyltransferase activity) in rats. These results, suggest that sinapic acid is not only a very important moiety in the pharmacological activities of tenuifolioside B and 3,6'-disinapoylsucrose but also a candidate for a cerebral protective and cognition-improving medicine.